

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-208836

(43) 公開日 平成4年(1992)7月30日

(51) Int.Cl.<sup>8</sup>

G 0 1 N 1/28  
33/543  
33/80

識別記号

庁内整理番号

U 7708-2 J

G 7906-2 J

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数 5 (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平2-418978

(22) 出願日 平成2年(1990)12月27日

(31) 優先権主張番号 4 5 8 1 4 3

(32) 優先日 1989年12月28日

(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 000000376

オリンパス光学工業株式会社  
東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号

(72) 発明者 高納 時男

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリ  
ンパス光学工業株式会社内

(72) 発明者 新村 寿信

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリ  
ンパス光学工業株式会社内

(72) 発明者 米川 裕之

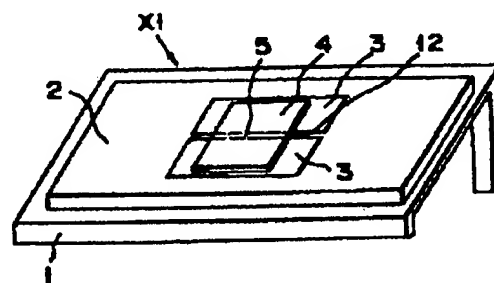
東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリ  
ンパス光学工業株式会社内

(54) 【発明の名称】 反応容器キット

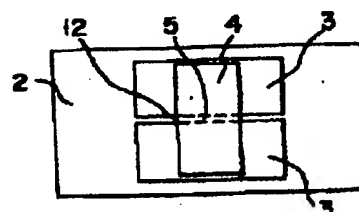
(57) 【要約】

【目的】 微量の試料を扱うことが可能であり、反応の有無の判定が短時間でかつ高感度に得ることができ、および得られた分布パターンを正確に測定することが可能な反応容器キットを提供することを目的とする。

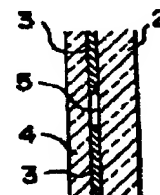
【構成】 毛管現象によってサンプルを吸引し得る断面積を有する反応部5と、反応部5の少なくとも一部に設けられた平坦な表面を有する透明板4とを具備する反応容器、およびこの反応容器を所定の角度だけ傾斜させるための反応容器載置台1とからなる。前記反応部は、通常、2枚の対向する透明板と、この2枚の透明板の間に挿入されたスペーサーとによって形成された間隙である。前記反応容器と前記反応容器載置台は、別々に成型されて測定の際に前記反応容器を前記反応容器載置台に載せてもよく、また、一体に成型されていても良い。また、前記反応容器の反応部には、抗原や抗体などの特異性を有する物質を固定化することもできる。



(A)



(B)



(C)

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】凝集反応の有無を判定するための反応容器キットであって、毛管現象によってサンプルを吸引し得る断面積を有する反応部と該反応部の少なくとも一部に設けられた平坦な表面を有する透明板とを具備する反応容器、および該反応容器を所定の角度だけ傾斜させるための反応容器載置台とを具備するキット。

【請求項2】前記反応部が、2枚の対向する透明板と、この2枚の透明板の間に挿入されたスペーサーとによって形成された間隙である請求項1に記載のキット。

【請求項3】前記反応容器と前記反応容器載置台とが一体に形成されている請求項1に記載のキット。

【請求項4】少なくとも反応容器の底面に特異結合性を有する物質を固定化した請求項1に記載のキット。

【請求項5】凝集反応による粒子の凝集の程度を判定する方法であって、特異結合性を有する粒子および特異結合性を有する物質を含有する粒子浮遊液を調製する工程と、請求項1に記載のキットの反応容器の反応部に、該粒子浮遊液を毛管現象により導入する工程と、該反応容器を、請求項1に記載のキットの反応容器載置台に載置して所定の時間静置する工程と、該反応容器の株に形成される粒子の分布パターンの形成過程および拡がりの程度を測定する工程とを有する方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】この発明は、凝集反応を行なうための反応容器キットに係り、特に免疫学的抗原抗体反応を利用した血液分析に用いられる反応容器キットに関する。

## 【0002】

【従来の技術】従来、免疫学的な凝集反応を利用した検出法に用いられる反応容器としては、例えば米国特許第4,303,616号公報に記載されたものを挙げることができる。これらの反応容器は、一般に、マイクロプレートと総称されている。

【0003】このような反応容器を用いる検出法としては、免疫学的な凝集反応に基づいてサンプル中に存在する抗原または抗体を検出する方法である粒子凝集法が知られている。この方法においては、被測定物質と特異的に結合する抗体または抗原が表面に固定化されている特定のマーカー粒子が用いられる。例えば、血液中のウイルスを検出する場合には、ウイルスに対する抗体を固定化した人工粒子がマーカー粒子として用いられる。この方法は、上記反応容器を用いて以下の通りに行われる。すなわち、反応容器内において上記マーカー粒子をサンプルに混合し、サンプル中に含まれる抗原または抗体との間で免疫反応を行なわせ、反応容器の所定の壁面（例えば底面）に集める。このようにして容器壁面に集められたマーカー粒子は、サンプル中の被測定物質との間で免疫反応が生じた場合と生じなかった場合とで分布パ

ーンが異なる。したがって、容器壁面に集められたマーカー粒子の分布パターンから、陽性または陰性の判定を行なうことが可能となる。

【0004】これとは別の方法としては、A.S.wienerおよびM.H.Hermanによって、混合凝集法が報告されている。この方法はその後次第に改良され、血液型の判定が可能になるまでに確立されている。例えば、血液型の判定は、上記反応容器を用いて次のようにして行なう。まず、一定濃度の赤血球および一定希釈率の血清を、それぞれ適量づつ反応容器内で混ぜ合わせる。次いで、一定時間静置する。前述の方法と同じように、赤血球が有する抗原と血清中の抗体との間で免疫反応が生じた場合と生じなかった場合とでは、沈殿した赤血球の分布パターンが異なる。したがって、沈殿した赤血球の分布パターンから、陽性または陰性の判定を行なうことが可能となる。

【0005】これらの方法によって得られた血球の分布パターンは肉眼で容易に判定することができるが、特開昭54-78499号公報に記載されている方法を用いて自動的に判定することも可能である。また、実公昭61-39321号公報には、光学的に平坦な焦点面上に粒子の凝集パターンを形成させ、凝集像の観察を容易にする方法が開示されている。

【0006】しかしながら、米国特許第4,303,616号公報に記載の反応容器は、安定でかつ正確な分布パターンを形成させるために少なくとも50 $\mu$ l程度の液量を必要とする。液量が50 $\mu$ lより少ない場合には、液面が表面張力によって不規則に盛り上がり、分布パターンが正確に形成されない。このため、この反応容器においては、反応液の深さが3mm以上となる。これは、分布パターンの形成時間が長くなる原因となっている。すなわち、沈殿して分布パターンを形成する赤血球等の粒子の移動距離が長くなり、その結果、分布パターン形成までの時間が長くなる。

【0007】液量を少なくすると分布パターンが正確に形成されないという上記の問題は、反応容器の内径を小さくすることにより多少改善することが可能である。しかし、その場合には反応溶液と反応容器壁面との間に表面張力が働き、やはり液面が不規則に窪んだり、盛り上がったたりする。その結果、形成された分布パターンを正確に測定することが困難になる。

【0008】また、容器の内径を小さくすると液量が少なくなり分布パターンの形成時間は短縮されるが、微量の試薬を扱わなければならないという問題が生じる。特に、液量が5 $\mu$ l以下である場合には、試薬の分注を再現性よく正確に行なうことが技術的に非常に困難になる。さらに、内径の小さな容器、例えば直径数百ミクロン程度の窪みを精度良く作成するためには極めて微細な表面加工が必要となり、効率よく作成することが困難になる。

【0009】一方、実公昭61-39321号公報に記載の方法は、反応容器への粒子浮遊液の注入にローリングポンプを用いるフロー方式の測定法である。しかしながら、このようなフロー方式の測定法では同時に測定できる検体または項目の数が限られるので、従来用いられているマイクロプレートのように、多数の検体を多項目にわたって同時に処理することは不可能である。また、ローリングポンプを用いた分注は誤差が大きく、 $\mu\text{m}$ のオーダーの微量試料の分析には適していない。

#### 【0010】

【発明が解決しようとする課題】この発明は、凝集反応の有無を判定するための反応容器キットであって、微量の試料を扱うことが可能であり、反応の有無の判定が短時間でかつ高感度に得ることができ、および得られた分布パターンを正確に測定することが可能な反応容器キットを提供することを目的とする。

#### 【0011】

【課題を解決するための手段】上記目的は、毛管現象によってサンプルを吸引し得る断面積を有する反応部と該反応部の少なくとも一部に設けられた平坦な表面を有する透明板とを具備する反応容器、および該反応容器を所定の角度だけ傾斜させるための反応容器載置台とを具備するキットによって達成される。前記反応部は、一般に、2枚の平坦な表面を有する透明板と、この2枚の透明板の間に所定の間隔を開けて挿入された2個のスペーサーとによって形成された間隙である。

【0012】前記反応容器載置台は、反応容器を所定の角度に傾斜させてその角度を保持するものである。反応容器は、傾斜させたときに、スペーサーを挿入した側面のいずれか一方が下になるように、この載置台に置かれる。

#### 【0013】

【作用】この発明による反応容器では、サンプルの注入は毛管現象によって行なわれる。すなわち、サンプルは反応部の開口部から毛管現象によって反応容器内に導入される。

【0014】上述のように、この発明の反応容器キットにおいては、反応容器の反応部は少なくとも一方が透明な2枚の板およびこれら板を微小の距離に保持するスペーサーによって周囲を囲まれている。加えて、反応時には、サンプルはこの反応部に充填されている。したがって、反応部におけるサンプルの液面は常に反応部の内壁に接しており、液面が平坦に保たれる。このため、粒子の分布パターンが乱れることがない。また、反応部の断面積は、毛管現象によってサンプルを反応部に導入することができるようなものであり、非常に小さいものである。このため、沈殿する粒子の移動距離が大幅に短くなり、分布パターンの形成を短時間で行うことができる。また、サンプルの注入は毛管現象を利用して行うので、例えば、サンプルを反応部の開口部に滴下するだけでよ

い。この場合、滴下する液量に関係なく、反応部におけるサンプルの液量は常に一定である。このため、正確な微量分注を特に必要とはしない。

#### 【0015】

【実施例】以下、この発明による反応容器キットの態様を図面を参照してより詳細に説明する。

【0016】第1図(A)はこの発明による反応容器キットの斜視図、第1図(B)は第1図(A)に示す反応容器のX1方向からの平面図、第1図(C)は第1図(B)に示す反応容器の断面を示す図である。これらの図に示されるように、このキットの反応容器においては、各々透明な部材からなる下板2と上板4とが2個のスペーサー3を介してほぼ平行に配置されている。下板2、上板4および2個のスペーサーで囲まれた部分5は、凝集反応が行なわれる反応部であり、かつサンプルを導入するサンプル導入路でもある。スペーサー3が挿入されていない2つの側面はサンプル導入口12であり、ここからサンプルの注入もしくは吸引を行う。反応容器載置台1には、水平面に対して所定の角度を有する傾斜面が設けられている。前記反応容器は、この反応容器載置台の傾斜面に載置される。

【0017】このキットの反応容器においては、スペーサー3の厚さ、すなわち下板2と上板4との距離は0.05-1.0mm、2個のスペーサー2の間隔は0.1-1.0mmが好ましい。また、反応部5の長手方向の長さ、すなわち上板4の幅は3-10mmであることが好ましい。さらに、このキットの反応容器載置台1に設けられた傾斜面は、水平面に対して10-60°の勾配を有することが好ましい。

【0018】この反応容器は、凝集反応の有無を確認する試験に使用することができる。例えば、血球と血清中の抗体との反応の有無を確認する試験にこの反応容器を使用する場合には、次のように行なう。

【0019】まず、一定濃度の血球浮遊液と一定希釈率の血清を試験管中で混合する。次に、その混合液をピペット等で採取し、反応容器のサンプル導入口12に適量を滴下する。滴下された混合液は、毛管現象によって反応部5全体に広がる。このまま反応容器を一定時間静置すると血球が沈殿する。しかしながら、反応容器が傾斜しているため、沈殿した血球は下板2上に堆積することなく傾斜した下板2に沿って下方に転がり落ちる。このときに反応部の下方に形成される血球の分布パターンにより、反応の有無を確認することができる。すなわち、抗原抗体反応によって血球が凝集した場合には、第2図(A)に示すように、傾斜した下板2の上方まで血球が一様に広がって沈殿した陽性パターン10を形成する。逆に、反応が起らずに血球が凝集しなかった場合には、全ての血球が傾斜した下板1を滑り落ちるために、第2図(B)に示すように、容器最下端に血球が線状に集積した陰性パターン9を形成する。

【0020】第1図(A)ないし第1図(C)に示されたキットの反応容器においては、スぺーサー3は矩形のものが用いられている。しかしながら、スぺーサーの形状は矩形に限られるものではなく、第3図ないし第4図に示されるスぺーサー6または7のような形状のものをを用いることもできる。このような形状のスぺーサーを用いることにより、サンプル導入口を広くすることができ、サンプルの分注が容易になる。

【0021】この発明の反応容器キットにおいては、反応容器と反応容器載置台を一体に成型することも可能である。そのような一体型反応容器第5図(A)および第5図(B)に示す。これらの図に示されるように、一体型反応容器8の傾斜面には、サンプルを毛管現象で吸引することが可能な断面積を有する管状の反応部5が設けられ、さらにこの反応部5の両端に凹状の液だまり9が設けられている。

【0022】一体型反応容器は、棒状に成型することも可能である。第6図(A)ないし第6図(C)に示す角柱型の棒状反応容器27には、水平面に対して所定の角度を有する貫通孔である反応部32、およびこの反応部32に連通する空洞部29が設けられている。反応部32は、サンプルを毛管現象によって吸引し得る断面積を有している。凝集反応の試験にこの棒状反応容器27を使用する場合には、次のように行なう。まず、この棒状反応容器27の端部30を予め調製した粒子浮遊液につける。このとき、サンプル導入口28から、毛管現象によって、粒子浮遊液が反応部32に導入される。浮遊液を反応部に導入した後、反応容器27を浮遊液から取り出し、水平に静置して10分間反応させる。反応後、上記方法と同様に、反応部32に形成された粒子の分布パターンを測定することにより、凝集反応の有無を測定することができる。この棒状反応容器27では、反応部32が空洞部29に連通し、空洞部29が開口部31を通して外界に通じているので、反応部32に不必要な圧力がかかることはない。また、開口部31から陰圧をかけることにより、サンプルや洗浄液を強制的に吸引することが可能である。反応部32の洗浄は、開口部31から洗浄液を導入することによっても行なうことができ、また開口部31に陽圧をかけるだけでも行うことが可能である。

【0023】上述した種々の形状の反応部の開口部の断面は、毛管現象(capillary action)によってサンプルを反応容器内部に吸引し得るものである。この断面積は、測定しようとするサンプルによって異なるが、サンプルが血液成分である場合には、 $0.2 \sim 5 \text{ mm}^2$ であることが好ましい。以下、この発明による反応容器キットを用いた凝集試験を説明する。

#### 【0024】実験例1

##### ヒトABO型血液型の判定

第1図(A)ないし第1図(C)に示す反応容器キットを用いたヒトABO型血液型の判定方法を第8図を用

いて説明する。

【0025】まず、採血した血液を遠心等の方法で、血球成分15と血清成分14とに分離する。この血清成分14は、血液がヘパリン等の抗凝固剤で処理されている場合には血漿である。次に、 $2 \mu\text{l}$ の沈殿した血球成分15と、 $18 \mu\text{l}$ の予め調製した溶液17とを試験管19に入れて混合し、前反応させる。ここで、溶液17は、標準抗A血清(オルソ社製)を生理食塩水で1/30に希釈した抗A血清希釈液である。前反応させた後、 $5 \mu\text{l}$ の血球浮遊液18を、分注器20で反応容器21の反応部5に分注する。下板2と上板4との間隔が $80 \mu\text{m}$ 、2個のスぺーサー3の間隔が $500 \mu\text{m}$ 、および反応部5の長手方向の長さが $250 \mu\text{m}$ の反応容器を用い、反応容器載置台の傾斜角が $45^\circ$ である場合には、10分程度で全てのヒト赤血球が反応部の下部に沈殿する。したがって、血球浮遊液18の分注の後、反応容器を $36^\circ\text{C}$ のインキュベーター中に約10分間静置する。

【0026】反応容器の上板と下板との距離および2個のスぺーサーの間隔は、粒子の沈殿に要する時間と密接な関係がある。すなわち、粒子の沈殿を短時間で終了させるためには両者とも短いことが好ましい。しかしながら、2個のスぺーサーの間隔を短くしすぎると、粒子の分布パターンが形成される部分が少なくなるために測定の際の誤差が大きくなる。また、反応部の長手方向の長さは、微量のサンプルが反応中に乾燥しないような十分な長さをとることが必要であり、しかも毛管現象でサンプルが反応部全体に充分に行き渡る長さであることが必要である。

【0027】反応が終了した後、反応容器21を測定部に移す。この測定部は、光源23、および血球分布パターンを拡大観察するための顕微鏡光学系25を具備し、さらに拡大された反応部内の血球の分布を撮像する受光素子26を有することもできる。抗原抗体反応の有無の判別は、反応容器21の反応部5を光学系25で拡大し、分布パターンを肉眼で観察することによって行なう。また、肉眼で観察する代わりに、受光素子26によって得られた画像をコンピューターで解析し、抗原抗体反応の有無を判別することも可能である。

【0028】測定された血球の分布が第2図(A)に示されるようなパターンを現わす場合には、サンプルの血球表面にA型抗原が存在し、血球同士が抗A抗体によって凝集していることを示している。また、血球の分布が第2図(B)に示されるようなパターンを現わす場合には、サンプルの血球表面にはA型抗原が存在せず、血球が反応容器の傾斜面を自由に転がっていったことを示している。

【0029】同様にして、サンプルの抗B血清に対する反応性を測定することができる。測定された抗A血清および抗B血清に対する反応性から、サンプルの血液型を判定することができる。すなわち、抗Aおよび抗B血清

の両者に対してサンプル中の血球が抗原抗体反応を示した場合に、サンプルの血液型はAB型であり、抗A血清のみにに対して反応した場合にはA型、抗B血清のみにに対して反応した場合にはB型、そしてどちらの抗血清に対しても反応しない場合にはO型である。従来60分を要していた血液型の判定が、この発明による反応容器キットを用いることにより、約10分で行なうことが可能となった。

#### 【0030】実験例2

##### HIVに対する抗体検査

第1図(A)ないし第1図(C)に示す反応容器キットを用いたHIVに対する抗体検査を、第8図を参照して説明する。

【0031】まず、採血した血液を遠心等の方法で血球成分15と血清成分14とに分離する。血液がヘパリン等の抗凝固剤によって処理されている場合には、血清成分14は血漿である。分離後の上清である血清成分14の2 $\mu$ lと予め調製された溶液17の25 $\mu$ lとを試験管19に入れて混合し、前反応させる。ここで、溶液17は、感作粒子を生理食塩水で1.0% (v/v) に希釈したものであり、この感作粒子の表面にはHIV抗原と同一のアミノ酸配列を有する有機的に合成したペプチドが固定化されている。この感作粒子としては、ポリスチレンやゼラチンを化学修飾した人工粒子、動物の赤血球をグルタルアルデヒドなどで固定したもの等を使用することができる。また、この粒子の感作させるための抗原として、不活性化したウイルスや、遺伝子操作を利用することにより大腸菌などによって生成された組換えタンパクを用いることもできる。前反応を終えた感作粒子浮遊液5 $\mu$ lを、分注器20を用いて反応容器21の反応部5に分注し、25~37

℃で10分間インキュベートする。

【0032】反応が終了した後、実験例1と同様の方法で、反応容器21の反応部5に沈殿した粒子の分布パターンを観察する。測定された粒子の分布が第2図(A)に示されるようなパターンを現わす場合には、HIVに対する抗体がサンプルの血清中に存在し、粒子同士が抗HIV抗体によって凝集していることを示している。また、粒子の分布が第2図(B)に示されるようなパターンを現わす場合には、感作粒子の表面抗原に反応する抗体がサンプル中に存在していないことを示している。

【0033】粒子に固定化する抗原の種類を変えることにより、HTLV-1、HB、淋病のようなHIV以外のウイルスや細菌に対する抗体検査を行なうことができる。また、抗体を感作した粒子を用いることにより、HBs、薬物、癌マーカー等に対する抗原検査を行なうことができる。さらに、異なる複数の色の粒子にそれぞれ異なる抗体または抗原を結合させ、受光素子26に例えばカラーCCDカメラを使用する場合には、一度に複数の抗体検査あるいは抗原検査を行うことが可能である。

【0034】この発明の反応容器キットを用いることに

より、従来の1/6の時間で、高い感度で判定を行なうことができる。また、高価な粒子試薬の使用量も従来より少なくて済む。

#### 【0035】実験例3

##### 抗体を予め固定化した反応容器を用いたABO型の表検査

まず、第1図(A)ないし第1図(C)に示した反応容器キットの反応部5に、以下に記載の方法に従って血球表面のA型抗原に対する抗血清を固定化する。

10 【0036】初めに、標準抗A血清(オルソ社製)を、0.15MのNaClを含む10mM Tris-HCl 緩衝液、pH 9で1/10に希釈する。この希釈液5 $\mu$ lを、反応容器の下板2の反応部5に滴下する。滴下した後、希釈液が乾燥しないように加湿状態を保ちながら37℃で1時間インキュベートする。次いで、0.15MのNaClを含有する10mMリン酸緩衝液、pH 7.2を滴下することにより、反応部5を洗浄する。軽く下板2を振ることによって洗浄液を除去した後、3% (w/v) ウシ血清アルブミンおよび0.15MのNaClを含有する10mlの10mMリン酸緩衝液、pH 7.2を反応部5に滴下し、加湿状態にして室温で1時間インキュベートする。この操作によって、反応部において非特異的に血球を吸着する部分がブロックされる。インキュベート終了後、0.15MのNaClを含有する10mMリン酸緩衝液、pH 7.2を用いて反応部5を洗浄する。反応容器を長期にわたって保存する場合には、最後の洗浄液に0.02% (w/v) Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>を添加して使用し、洗浄後には4℃で保存する。下板2だけではなく上板4も血球の非特異的な結合が生じないように処理をする。すなわち、3% (w/v) ウシ血清アルブミンおよび0.15MのNaClを含有する

20 10mMリン酸緩衝液、pH 7.2に室温で1時間漬けた後、0.15MのNaClを含む10mMリン酸緩衝液、pH 7.2で洗浄する。反応容器を長期間保存する場合には、下板の場合と同様に、最後の洗浄液に0.02% (w/v) Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>を添加し、4℃で保存する。これらの下板2および上板4に加えて2個のスペーサー3を用いて反応容器を組み立て、両面テープや接着剤で固定する。

【0037】次に、この抗血清を固定化した反応容器キットを用いたABO型の表検査を第8図を参照して説明する。なお、ここで用いるキットは、スペーサーの厚さが80 $\mu$ m、2個のスペーサーの間隔が0.5mmおよび反応部の長手方向の長さが5mmである反応容器と傾斜角が45°の反応容器載置台とからなるキットである。

【0038】採血した血液を遠心等の方法で血球成分15と血清成分14とに分離する。このとき、血液がヘパリン等の抗凝固剤によって処理されている場合には、血清成分14は血漿である。次に、沈殿した2 $\mu$ lの血球成分15と98 $\mu$ lの溶液17とを試験管19内で混合し、2%血球浮遊液18を調製する。ここで、溶液17は生理食塩水である。この血球浮遊液18を、上述のように抗A血清を固定化した反応容器21の反応部5に、分注器20を用いて注入

する。分注後、反応容器を反応容器載置台1の傾斜面に載置し、反応容器に振動を与えないようにして、36℃程度で10分間インキュベートする。サンプルの分注は、反応容器21を予め反応容器載置台1に載置した状態で行なうこともできる。

【0039】反応が終了した後、実験例1と同様の方法で、反応容器19の反応部5に沈殿した粒子の分布パターンを観察する。サンプルの血球表面にA型抗原が存在する場合には、血球と反応容器に固定化された抗A血清とが結合し、血球が反応部5のほぼ全体に一樣に分布する。したがって、この場合の血球の分布は第7図(A)に示されるようなパターンを現わす。また、サンプルの血球表面にはA型抗原が存在しない場合には、血球が反応容器に固定化された抗A血清と結合しないので、血球が傾斜した反応容器21の下板2上を自由に転がっていく。したがって、この場合の血球の分布は第7図(B)に示されるようなパターンを現わす。このように、反応後の血球の分布パターンの違いから、サンプルの血球表面のA型抗原の有無を判定することができる。同様に、サンプルの抗B血清に対する反応性を測定することにより血球表面のB型抗原の有無を判定することができる。

【0040】測定された抗A血清および抗B血清に対する反応性から、サンプルの血液型を判定することができる。すなわち、抗Aおよび抗B血清の両者に対してサンプル中の血球が抗原抗体反応を示した場合には、サンプルの血液型はA B型であり、抗A血清のみにに対して反応した場合にはA型、抗B血清のみにに対して反応した場合にはB型、そしてどちらの抗血清に対しても反応しない場合にはO型である。

【0041】従来60分を要していた血液型の判定が、この発明による反応容器を用いることにより、約10分で行なうことが可能となった。

#### 【0042】実験例4

抗原を予め固定化した反応容器を用いた、HIVに対する抗体検査

実験例3における抗血清の代わりに、種々の抗原を反応容器に固定化することによって各種の抗体検査を行なうことができる。そのような方法による、HIVに対する抗体検査方法を、第9図を参照して説明する。

【0043】まず、実験例3と同様の方法で、反応容器の反応部5にHIV抗原を固定化する。反応容器に固定化するHIV抗原としては、化学的に合成されたHIVウイルスの表面抗原、大腸菌によって生産されたHIVの組換えタンパク質、HIVウイルスそのものなどを使用することができる。

【0044】次に、採血した血液を遠心等の方法で血球成分15と血清成分14とに分離する。このとき、血液がヘパリン等の抗凝固剤で処理されている場合には、血清成分14は血漿である。得られた血清成分14を試験管19に2

μl採取し、さらに生理食塩水18μlを添加して混合する。この血清希釈液27の5μlを、HIV抗原を固定化した反応容器21に、分注器34を用いて分注する。分注後、反応容器を37℃で2分間インキュベートする。反応後、ノズル35を用いて、洗浄用の生理食塩水を反応容器21の反応部5に送り込み、同時に反対側からノズル36で廃液を吸引する。これにより、反応部5を洗浄し、反応容器21に固定化された抗原と反応しなかった血清成分を洗い流すことができる。反応部5に残存する洗浄液は、ろ紙を用いて拭き取ったり、ノズルから空気を吹付けて除去することが好ましい。

【0045】次いで、ヤギ抗ヒト抗体を固定化した粒子試薬33を、ノズル37を用いて反応容器に分注し、37℃で10分間インキュベートする。ここで用いる抗ヒト抗体としては、マウス等が産生したモノクローナル抗体を用いることもでき、さらにプロテインA等の抗体に結合する性質を有する物質を用いることもできる。また、抗体を固定化する粒子には、グルタルアルデヒド等によって固定された赤血球やポリスチレン等の人工粒子を用いることができる。

【0046】反応が終了した後、実験例1と同様の方法で、粒子の分布パターンを観察する。HIVに対する抗体がサンプルの血清中に存在する場合には、この抗体が反応容器に固定化されたHIV抗原に結合し、さらに、表面に抗ヒト抗体が固定化された粒子が抗原に結合した抗体に結合する。したがって、この場合の粒子の分布は、第7図(A)に示されるようなパターンを現わす。また、サンプルの血清中にHIVに対する抗体が存在しない場合には、粒子は反応を起こすことなく傾斜した反応容器の下板上を自由に転がっていく。したがって、この場合の粒子の分布は第7図(B)に示されるようなパターンを現わす。

【0047】この反応容器キットを用いることにより、従来要した60-120分を大幅に短縮した時間で、高感度の検査を行なうことができる。反応容器に固定化する抗原の種類を変えることにより、HTLV-I、HTLV-IIのようなHIV以外のウイルスや細菌に対する抗体の検出も可能になる。また、一般に、抗体は2ないし10個の抗原結合部位を有している。したがって、反応容器に固定化した抗原と同じ抗原を固定化した粒子も、粒子試薬31として使用することができる。さらに、反応容器と粒子の両者に抗体を固定化することにより、従来サンドイッチ法として知られる抗原検査を行なうことも可能である。

#### 【0048】

【発明の効果】本発明によれば、微量のサンプルを毛管現象により反応部へ導入するから、反応部におけるサンプル液量は常に一定である。したがって、再現性良く高感度に凝集試験を行うことができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】第1図(A)は、この発明の反応容器キットの一実施態様を示す斜視図、第1図(B)は、第1図(A)に示したキットにおける反応容器のX1方向から見た平面図、第1図(C)は、第1図(B)に示した反応容器の断面を示す図、

【図2】第2図(A)は、第1図に示した反応容器キットを用いた凝集試験において、凝集反応があった場合の沈殿粒子の分布パターンを示す図、第2図(B)は、第1図に示した反応容器キットを用いた凝集試験において、凝集反応が無かった場合の沈殿粒子の分布パターンを示す図、

【図3】第3図(A)は、スペーサーの形状が異なる変形例を示す斜視図、第3図(B)は、第3図(A)に示すキットにおける反応容器の平面図、

【図4】第4図(A)は、スペーサーの形状が異なる他の変形例を示す斜視図、第4図(B)は、第4図(A)に示すキットにおける反応容器の平面図、

【図5】第5図(A)は、反応容器と反応容器載置台とを一体に形成した変形例を示す斜視図、第5図(B)は、第5図(A)に示すキットの平面図、

【図6】第6図(A)は、反応容器と反応容器載置台と

を一体に形成した別の変形例を示す斜視図、第6図(B)は、第6図(A)に示すキットのY2方向から見た平面図、第6図(C)は、第6図(A)に示すキットのX2方向から見た平面図、

【図7】第7図(A)は、反応部に抗体を固定化した第1図で示した反応容器キットを用いた凝集試験において、凝集反応があった場合の沈殿粒子の分布パターンを示す図、第7図(B)は、反応部に抗体を固定化した、第1図で示した反応容器キットを用いた凝集試験において、凝集反応が無かった場合の沈殿粒子の分布パターンを示す図、

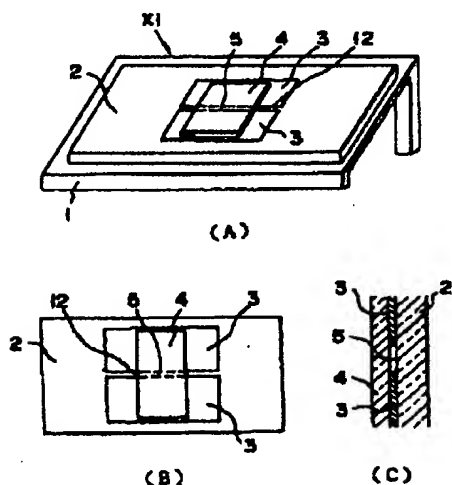
【図8】第8図は、第1図に示す反応容器キットを用いた凝集試験の工程を示す図、

【図9】第9図は、第1図に示す反応容器キットを用いた凝集試験の別の工程を示す図である。

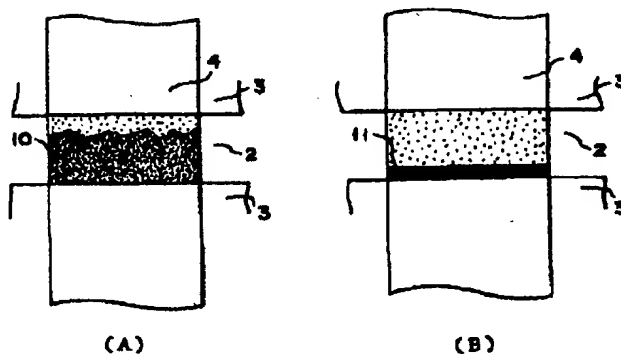
【符号の説明】

- |               |         |
|---------------|---------|
| 1 反応容器載置台     |         |
| 2 下板          | 3 スペーサー |
| 4 上板          | 5 反応部   |
| 10 12 サンプル導入路 |         |

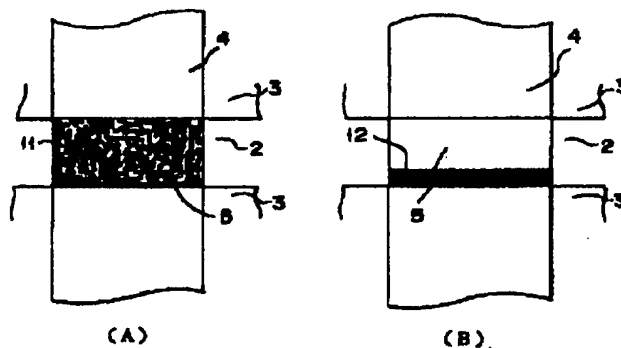
【図1】



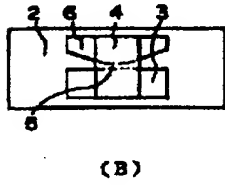
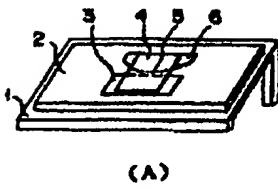
【図2】



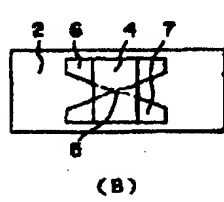
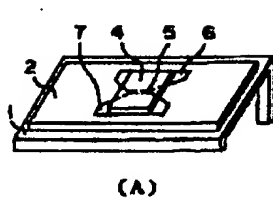
【図7】



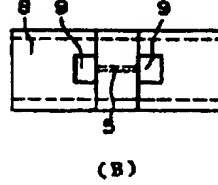
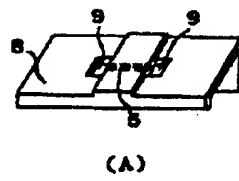
【図3】



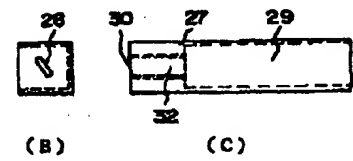
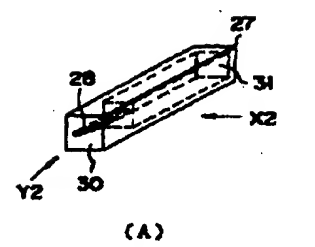
【図4】



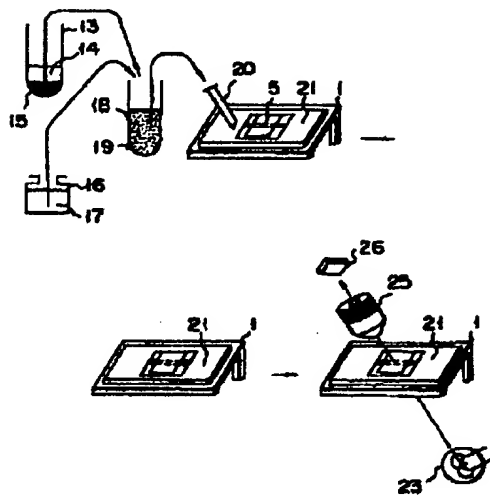
【図5】



【図6】



【図8】



【図9】

